

Kennziffer: 2474

Thema:

Optimierung von Brauhefen mittels *Inverse Metabolic Engineering*

Autoren:

Duong Cam Thuy, Elke Nevoigt, Ulf Stahl

Abstract

Ausgangspunkt für das Forschungsprojekt waren Brauhefestämme, in denen ein brauerei-relevantes Merkmal (z.B. die Diacetylproduktion) quantitativ unterschiedlich ausgeprägt ist. Mit Hilfe globaler Expressionsanalysen wurden die Unterschiede zwischen den Stämmen auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Zurzeit wird auf gentechnischem Wege getestet, ob die Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expression der identifizierten Gene tatsächlich zu dem gewünschten Phänotyp (niedrige Diacetylproduktion) führt.

1. Problemstellung

Brauhefen sind keine optimalen Organismen, wenn es um die Effektivität und die Kontrollierbarkeit des Brauprozesses bzw. der Bierqualität geht. Daher gab es in der Vergangenheit eine Reihe von Versuchen, die Eigenschaften von Brauhefen auf rationalem Wege zu verbessern, d.h. durch gezielte, sinnvolle Veränderungen an einzelnen Genen. Derartige Modifikationen erfordern jedoch ein detailliertes Wissen sowohl über die beteiligten Stoffwechselwege und Metabolite, Enzyme und deren Kinetik als auch über die entsprechenden Gene. Häufig werden solche rationalen Ansätze des *Metabolic Engineering* durch andere limitierende Schritte, unbekannte Regulationsmechanismen bzw. gekoppelte Stoffwechselwege vereitelt. Bei Brauhefen kommt erschwerend hinzu, dass das Wissen über die Genetik und die Physiologie im Vergleich zur Bäckerhefe relativ gering ist und dass es sich bei diesen Organismen, zumindest bei den untergärigen Arten, um genetische Hybride handelt. Eine alternative Strategie zur Stammoptimierung ist das sogenannte *Inverse Metabolic Engineering*, welches, anders als die rationalen Strategien, kein Vorwissen erfordert.

2. Forschungsziel

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Optimierung von Brauhefen mittels *Inverse Metabolic Engineering*. Diese Vorgehensweise umfasst: i) die Identifizierung der relevanten physiologischen Eigenschaften, ii) die Bestimmung der genetischen Basis für diese Eigenschaften und iii) die Entwicklung von Methoden für eine gezielte Optimierung der Stämme ausgehend von dem gewonnenen Wissen. Beispielfhaft soll zunächst die Diacetylproduktion von Brauhefen vermindert werden. Diacetyl ist ein unerwünschtes, butterartig schmeckendes Nebenprodukt, welches während der Hauptgärung entsteht. Um das Diacetyl im sogenannten Jungbier in die geschmacklich weniger auffälligen Produkte Acetoin und 2,3-Butandiol zu überführen, sind Nachgärungen von 2-3 Wochen erforderlich. Eine Brauhefe, die wesentlich weniger Diacetyl produziert, würde den Brauereien Lagerzeiten (und –kapazitäten) ersparen und wäre daher von erheblichem wirtschaftlichen Nutzen. Das geplante Forschungsprojekt hat daher die Verminderung der Diacetylproduktion bei Brauhefen zum Ziel.

Der innovative Charakter des Forschungsvorhabens besteht neben der angestrebten Verkürzung der Lagerzeit des Bieres darin, dass die modernsten Methoden der globalen

Expressionsanalyse (siehe unten) für die Optimierung von Brauhefen nutzbar gemacht werden. Das Verfahren hat Modellcharakter, da die gleiche Methodik auch für die Optimierung anderer Gäreigenschaften bei weiteren industriell relevanten Hefen angewandt werden kann. Aus wissenschaftlicher Sicht ist es äußerst interessant, bisher unbekannte Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp bei Brauhefen aufzudecken.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleichende physiologische Charakterisierung der ausgewählten Brauefestämme mit unterschiedlicher Diacetylproduktion

Innerhalb der ersten Phase der Projektlaufzeit wurden zunächst 3 untergärrige Brauefestämme, die erfahrungsgemäß unterschiedliche Mengen an Diacetyl produzieren, eingehend bezüglich ihrer Braueigenschaften charakterisiert.

Die vergleichenden Fermentationen im 3-Liter-Maßstab unter Brauerei-relevanten Bedingungen (Würze als Substrat, Gärtemperatur: 12°C) bestätigten die Unterschiede in der Diacetylproduktion der untersuchten drei Hefestämme (Abb. 1). Im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen wies der Stamm B eine auffällig geringe Diacetyllakkumulation im Medium auf. Im Vergleich zum Stamm B bildete der Stamm A etwa doppelt so viel und der Stamm C etwa dreimal so viel Diacetyl.

Prinzipiell stellt Stamm B in Bezug auf die Diacetylbildung bereits einen optimalen Brauefestamm dar. Am Ende der Hauptfermentation, d.h. bei einem scheinbaren Extrakt (Es) von 3%, lag der Diacetylgehalt hier bei nur 0,15 mg/ml, was dem Geschmacksschwellenwert entspricht.

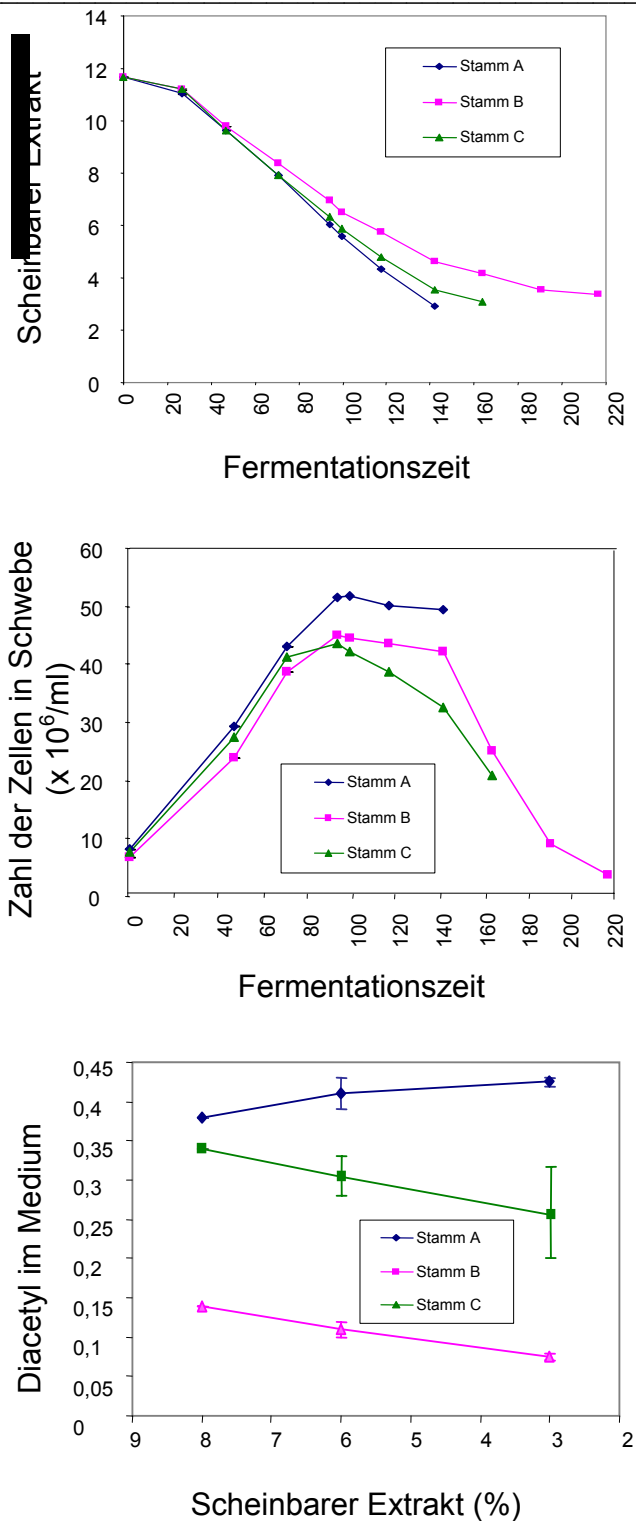


Abb. 1

Substratabnahme, Zahl der Zellen in Schwebel und Akkumulation des Nebenproduktes Diacetyl von drei verschiedenen Brauereifestämmen während der Hauptgärung unter Brauerei-ähnlichen Bedingungen (11,5% Würze, 12°C, Rührung 200 rpm, Gäraufsätze). Die Gärungen wurden abgebrochen, wenn der scheinbare Extrakt bei etwa 3% lag. Die Diacetylkonzentrationen wurden gegen den scheinbaren Extrakt aufgetragen, um einen objektiven Vergleich (d.h. Diacetylproduktion bezogen auf verbrauchtes Substrat) zu gewährleisten.

Allerdings besitzt der Stamm B eine andere Eigenschaft, die ihn trotz der extrem niedrigen Diacetylproduktion für den Einsatz in der Brauereipraxis ungeeignet macht. Wie Abb. 2 zeigt, setzt die Flockulation am Ende der Gärung bei diesem Stamm wesentlich früher ein als gewünscht. Diese Eigenschaft ist deshalb unbrauchbar, weil sie mit einer unvollständigen Extraktvergärung (niedriger Endvergärungsgrad) und einem niedrigeren Alkoholgehalt einhergeht. Folglich ist Stamm B in Bezug auf die Diacetylproduktion optimal, die Stämme A und C dagegen in Bezug auf die Flockulation. Die Herausforderung für das Forschungsprojekt besteht nun darin, die genetischen Eigenschaften für diese Unterschiede aufzudecken und später möglichst nach Wunsch in einem Stamm vereinen zu können.

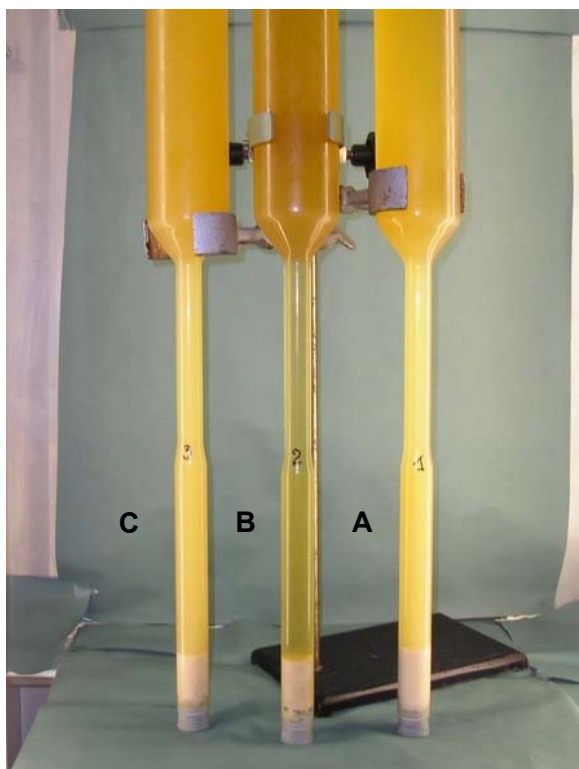


Abb. 2

Unterschiede im Flockulationsverhalten der drei ausgewählten Brauhefestämme A, B und C in Lietz-Gärrohren. Die Fotos wurden am Ende der Hauptgärung aufgenommen, d.h. bei einem scheinbaren Extrakt von ca. 3%. Die Flockulation von Stamm B ist stärker als im Regelfall erwünscht.

3.2. Vergleichende Proteomanalyse

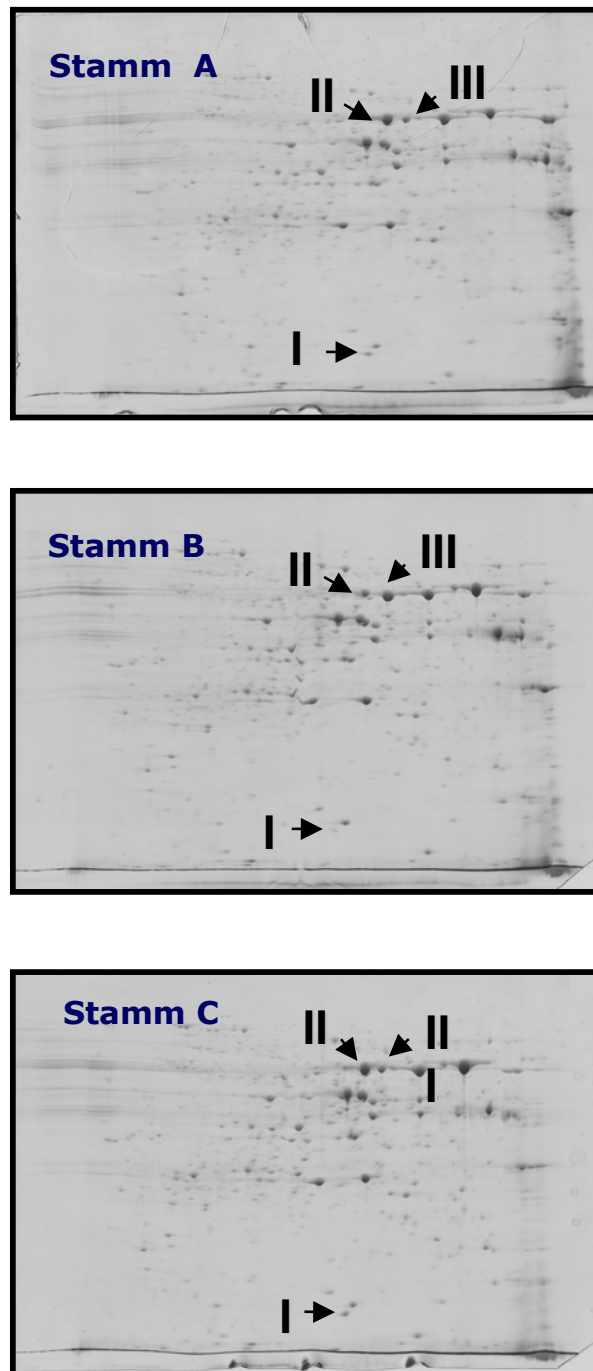
Zur Aufklärung der genetischen Unterschiede zwischen den drei Hefestämmen mit unterschiedlicher Diacetylbildung und Flockulation sollen vergleichende globale Expressionsanalysen der Hefestämme auf der Ebene der Transkripte/mRNA (Transkriptom) und der Proteine (Proteom) durchgeführt werden. Zunächst lag das Augenmerk dabei auf der Untersuchung des Proteoms. Dazu wurde Gesamtprotein aus den Hefestämmen jeweils aus der Hauptgärphase (log. Wachstumsphase der Hefen) des Brauprozesses beim scheinbaren Extrakt von 8% isoliert.

Die Proteinextrakte der Hefestämme A, B und C wurden mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, und anschließend wurden die Proteinmuster miteinander verglichen. Alle Untersuchungen erfolgten dreifach. In Abbildung 3 ist repräsentativ je ein 2D-Gel für jeden der drei Hefestämme gezeigt.

Die Auswertung aller Gelphotos mit Hilfe der Image-Master 2D Software ergab in allen Gelen drei reproduzierbare Unterschiede zwischen den betrachteten Hefestämmen. Es konnten allerdings nur signifikante Unterschiede zwischen dem Stamm B und den anderen beiden Stämmen detektiert werden. Dieses Ergebnis passt zu den physiologischen Unterschieden, wo sich der Stamm B ebenfalls signifikant von den anderen beiden Stämmen abhebt.

Die Proteinspots, welche die Unterschiede zwischen den Stämmen repräsentieren (siehe Abb. 3, Bezeichnung I, II und III), wurden in zwei unabhängigen Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

Wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist, wurden alle drei Spots als Enolasen (bzw. deren Degradationsprodukte) identifiziert. Da Brauhefen genetische Hybride aus *S. cerevisiae* und einer anderen *Saccharomyces*-Hefe (vermutlich *S. bayanus*) darstellen, enthalten sie nicht nur zwei, sondern vier Isoenzyme der Enolase. Die Sequenzen der Nicht-*S. cerevisiae*-Gene sind nicht bekannt. Daher kann aus den bisherigen Daten noch kein einwandfreier Rückschluß gezogen werden, welche(s) der Isoenzyme in den Stämmen unterschiedlich exprimiert ist. Auch ein Zusammenhang zwischen den Unterschieden in der Enolaseexpression und den Phänotypen (Diacetylbildung bzw. Flockulation) ist noch nicht offensichtlich. Bekannt ist allerdings, dass Enolase als ein Bestandteil der Lektinfraktion der Hefezellwand identifiziert wurde und Lektine bekanntermaßen an der Flockulation beteiligt sind.

**Abb. 3**

Vergleichende Proteomanalysen der Hefestämme A, B und C mittels zweidimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Pfeile markieren solche Proteinspots, die sich bei den drei untersuchten Stämmen signifikant in ihrer Intensität unterscheiden. Die Proteine wurden aus Zellen geerntet, die aus der Hauptgärphase entnommen (Scheinbarer Extrakt von 8%) wurden.

Tab. 1

MALDI-TOF/ MS Analyse der drei Proteinspots, deren Intensität in Stamm B signifikant höher bzw. niedriger war als in den Stämmen A und C. Die Proteine wurden jeweils aus Hefezellen isoliert, die während der Fermentation von Bierwürze (ca. 11,5 % Stammwürze) bei einem scheinbaren Extrakt von 8% geerntet wurden.

Spot	Rank	Protein Name	Protein MW (kDa)	Protein PI	Peptide Count	Protein Score	Protein Score C.I. %
I (a)	1	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	22	574	100
	2	Enolase 1; <i>S.cerevisiae</i>	46,6	6,17	15	282	100
I (b)	1	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	22	484	100
	2	Enolase 1; <i>S.cerevisiae</i>	46,6	6,17	14	267	100
II (a)	1	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	5	118	100
II (b)	1	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	8	122	100
III (a)	1	Enolase 1; <i>S.cerevisiae</i>	46,6	6,17	5	327	100
	2	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	7	268	100
III (b)	1	Enolase 2; <i>S.cerevisiae</i>	46,8	5,67	8	289	100
	2	Enolase 1; <i>S.cerevisiae</i>	46,6	6,17	6	154	100

3.3. Vergleichende Transkriptomanalyse

Für die vergleichende Expressionsanalyse der Hefestämme auf der Ebene der mRNA wurde die Gesamt-RNA von allen Hefestämmen aus Zellen der Hauptgärphase (scheinbarer Extrakt von 8%) isoliert. Diese RNA wurde genutzt, um Kohybridisierungen von Hefe-Microarrays (*Full Service* der Firma *Ocimum Biosolutions*) durchzuführen.

Die vergleichenden Kohybridisierungen wurden in drei unabhängigen Untersuchungen mit RNA-Proben aus drei Fermentationen durchgeführt. Jede einzelne vergleichende Analyse ergab zwischen 50 bis 300 Unterschiede, d.h. Gene, deren Expression in einem der zwei zu vergleichenden Stämme mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt war. Die Endauswertung aller Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen A und C, beim Vergleich von Stamm B und C blieben fünf reproduzierbare Unterschiede übrig (Tabelle 2). Die Differenzen der Daten können damit erklärt werden, dass bei jeder Fermentation ein anderer Würzesud verwendet wurde, was zu einer höheren Variabilität der biologischen Replikate geführt hat. Allerdings sind die schließlich identifizierten fünf Unterschiede zwischen Stamm B und C als signifikant einzuschätzen. Dies wurde durch einen t-Test belegt (Tab. 2).

Unter den identifizierten fünf Genen sind interessanterweise 3 Gene, die mit der Flockulation assoziiert sind und bei Stamm B höher exprimiert wurden. Daher korrelieren

an dieser Stelle die identifizierten genetischen Unterschiede sehr gut mit den phänotypischen Unterschieden zwischen den Stämmen.

Die anderen beiden detektierten, signifikanten Unterschiede in Tab. 2 (höhere Expression in Stamm B) lassen sich dagegen nicht so offensichtlich auf den Phänotyp zurückführen. Es wäre zu hoffen, dass sie auf eine bisher unbekannte Weise mit der Diacetylbildung zusammenhängen und mögliche Targetgene für eine Verminderung der Diacetylproduktion darstellen. Um diese Frage zu klären, werden die beiden Gene gegenwärtig in Stamm C überexprimiert. Anschließend soll der Phänotyp des modifizierten Stammes analysiert werden.

Tab. 2

Gene, deren Expression bei einem Vergleich der Hefestämme B und C mit Hilfe einer Microarray-basierten Transkriptomanalyse signifikant unterschiedlich waren (d.h. mindestens 2-fach erhöht oder erniedrigt). Es wurden drei unabhängige Kohybridisierungen mit RNAs aus drei unabhängigen Fermentationen durchgeführt.

Gene name	ORF name	Gene description/ function	Normalized spot intensities (mean values and standard deviations)		Average expression ratios (strain I/strain II)	p-value
			Strain I	Strain II		
<i>FLO5</i>	YHR211w	member of the Flo1p family of flocculation proteins	5.5 ± 3.1	0.3 ± 0.2	17.0	<0.001
<i>FLO1</i>	YAR050w	cell wall protein involved in flocculation	22.6 ± 2.9	1.4 ± 0.2	16.7	<0.001
-	YAL065c	strong similarity to Flo1p - putative pseudo-gene	6.1 ± 1.8	1.2 ± 0.2	5.3	<0.001
			11.7 ± 3.1	2.3 ± 0.5	5.1	0.001
			2.6 ± 0.3	1.1 ± 0.1	2.4	0.007

Bezüglich der Expression verschiedener Enolaseisoenzyme konnten auf der mRNA-Ebene keine Unterschiede identifiziert werden, obwohl auf Proteinebene deutliche Unterschiede zwischen Stamm B und C bzw. Stamm B und A erkennbar waren. Dies könnte in der Homologie der Isogene zwischen den *S. cerevisiae*- und den (bisher unbekannt) Nicht-*S. cerevisiae*-Formen liegen, die eine Unterscheidung durch die auf dem Microarray gespotteten Sonden nicht zulässt.